

## APOPTOZA – DETEKCIJA I KVANTIFIKACIJA

József Petrik, Lada Rumora, Dubravka Juretić, Ivana Čepelak

Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**SAŽETAK:** Apoptoza, programirana stanična smrt, nije samo proces prirodnog obnavljanja stanica i tkiva nego je prepoznata i kao značajan čimbenik u razvoju velikog broja patoloških stanja. Razumijevanje procesa apoptoze predstavlja osnovu za primjenu tih spoznaja u dijagnostičke i terapijske svrhe.

U ovom radu sažeto su opisane tehnike i metode otkrivanja i/ili kvantifikacije apoptoze. Ove tehnike temelje se na analizi morfologije stanica svjetlosnom ili elektronskom mikroskopijom, odnosno na biokemijskim obilježjima, na internukleosomnoj fragmentaciji DNA, na označavanju jednostrukih ili dvostrukih lomova molekula DNA metodama TUNEL ili ISEL. Nadalje, raspravljali smo o pojedinim metodama koje prate promjene u citoplazmi, npr. određivanjem aktivnosti pojedinih kaspaza, ili promjene na staničnoj membrani, npr. određivanjem prisutnosti fosfatidilserina na vanjskoj strani stanične membrane. Prednosti i nedostaci navedenih metoda također su opisani u ovome preglednom članku.

**Ključne riječi:** apoptoza

### 1. UVOD

Apoptoza je programirana stanična smrt, koju su opisali Kerr i suradnici (1) još 1972. godine. Ovaj način umiranja stanica patolozi su i prije primjećivali, ali mu nisu pridavali veliko značenje. Međutim, u zadnjih desetak godina intenzivno se istražuju molekularni mehanizmi te fiziološko i patofiziološko značenje apoptoze.

Tijekom embrionalnog razvoja, ali i nakon rođenja, pojedine stanice umiru definirano u prostoru i vremenu, tj. podvrgavaju se apoptozi. Programirana stanična smrt kontrolirana je genima, pri čemu stanica sebe uništava, tj. vrši "samoubojstvo".

U normalnim fiziološkim uvjetima u ljudskom organizmu dnevno apoptozom umire približno sto milijardi ( $10^{11}$ ) stanica, no razmnožavanjem stanica toliko ih i nastaje. U odnosu na ukupan broj stanica u tijelu dnevno apoptozom prosječno umire tisućiti dio stanica, u nekim tkivima više, a u drugima manje.

Morfološke promjene stanica mogu uzrokovati različiti čimbenici poput hipoksije, slobod-

nih reaktivnih radikala, ksenobiotika i lijekova, genetskog nedostatka, imunološke reakcije, poremećaja u prehrani, mikrobioloških uzročnika, fizikalnih uzroka te starenja (2, 3).

Redoslijed biokemijskih zbivanja odgovornih za oštećenje stanice vrlo je složen. Mnogobrojni makromolekularni, enzimski, biokemijski sustavi i organele unutar stanice toliko su međuovisni da je primarno mjesto oštećenja teško razlikovati od sekundarnih posljedica. Točan trenutak nastanka nepovratnog oštećenja i smrti stanice još je uvijek u većini slučajeva neodređen.

Oblici stanične smrti su nekroza i apoptoza. Glavna obilježja tih procesa sažeta su u tablici 1.

Nekroza nastupa neplanirano kao posljedica znatnog oštećenja stanične membrane. Stanice mogu opstati samo u okolišu dinamičke ravnoteže, u kojem svoju građu i funkciju neprestano usklađuju s promjenjivim zahtjevima i oštećenjima. Sve dok ta oštećenja ne postanu prejaka, stanice nastoje održati normalnu strukturu i funkciju, tj. homeostazu. Stanično je oštećenje reverzibilno do određene točke, ali kod intenzivnog ili dugotrajnog stresa stanica podliježe nepovratnom oštećenju te je predodređena za smrt. Tako može nastati koagulacijska nekroza popraćena denaturacijom citoplazmatskih proteina i raspadanjem staničnih organela (4).

Adresa za dopisivanje:

Doc. dr. József Petrik, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, A. Kovačića 1, tel: +385-1-4612606, fax: +385-1-4612716, e-mail: jpetrik@pharma.hr

Tablica 1. Obilježja apoptoze i nekroze

Table 1. Features of apoptosis and necrosis

Apoptoza	Nekroza
<input type="checkbox"/> Programirana stanična smrt <input type="checkbox"/> Očuvan integritet stanične membrane <input type="checkbox"/> Kondenzacija organela unutar stanice <input type="checkbox"/> Pojava apoptotičkih tjelešaca <input type="checkbox"/> Oštećenje membrane mitohondrija <input type="checkbox"/> Smrt pojedinačne stanice <input type="checkbox"/> Makrofagi fagocitiraju apoptotična tjelešca <input type="checkbox"/> Proces troši stanični ATP <input type="checkbox"/> Nema razvoja upale	<input type="checkbox"/> Neplanirana stanična smrt <input type="checkbox"/> Integritet membrane nije sačuvan <input type="checkbox"/> Liza i bubrenje stanice <input type="checkbox"/> Nema mjehurastih tvorevina <input type="checkbox"/> Bubrenje i oštećenje svih organela <input type="checkbox"/> Smrt cijele skupine stanica <input type="checkbox"/> Makrofagi fagocitiraju oslobođeni stanični sadržaj <input type="checkbox"/> Proces ne troši ATP <input type="checkbox"/> Rezultira upalnim procesom

Apoptoza je drugi značajan oblik stanične smrti, a može igrati važnu ulogu kako u fiziološkim tako i u patološkim procesima (1,3,5,6,7). U razumijevanju i otkrivanju apoptoze značajnu ulogu imaju tehnike poput svjetlosne i elektronske mikroskopije, protočna citometrija, metode koje prate kidanje i fragmentaciju molekule DNA, promjene propusnosti membrane, promjene na staničnoj membrani te aktivaciju kaspaza odnosno pojavu neoepitopa karakterističnih za proces apoptoze (7,8,9,10).

## 2. APOPTOZA

Apoptoza je proces kontroliranog uništavanja stanice u kojoj sudjeluje sama stanica. Apoptotične stanice podliježu nizu vidljivih morfoloških promjena na putu do svoje smrti. Pojave koje karakteriziraju stanice u apoptozi su: 1. kondenzacija kromatina i stvaranje mjehurića na membranama, 2. kidanje molekule DNA na ulomke veličine nukleosoma, 3. razlaganje citoskeleta i formiranje apoptotičkih tjelešaca.

Proces apoptoze započinje vanjskim ili unutarnjim putem aktivacije, tzv. **inicijacijskom fazom**, koju pokreću signali poput Fas liganda, čimbenika nekroze tumora- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), nedostatak čimbenika rasta, otkazivanje supresorske aktivnosti anti-apoptotičnih članova Bcl-2, oštećenja na molekuli DNA itd. Nakon toga slijedi **faza odlučivanja**, u kojoj značajna uloga pripada kaspazama (engl. caspases, cysteinyl aspartate-specific proteases), koje su odgovorne za smišljeno razlaganje stanice u apoptotička tjelešca. Kaspaze su prisutne u stanici kao neaktivni proenzimi, a većina se aktivira proteolitičkim kidanjem (11,12,13).

Kaspaze-8 i -10 aktiviraju se vezivanjem tzv. liganada smrti na tzv. receptore smrti, pri čemu dolazi do agregacije (trimerizacije) membranskog receptora (11). U receptore smrti ubrajaju

se neki članovi obitelji TNFR (TNF receptor) koji imaju unutarstanične domene smrti (DD), koje, kao što im i samo ime kazuje, služe kao signal za poticanje umiranja stanice. Vezanjem liganda na receptor smrti formira se veliki kompleks na receptoru nazvanom DISC (death-inducing-signaling complex), koji nastaje zbog interakcije među proteinima DD i efektorskim domenama smrti (DED). Kompleks privlači i kaspaze -8 ili -10 preko DED u prodomeći ovih enzima, te se one, vjerojatno zbog visoke lokalne koncentracije aktiviraju, čime započinje kaskada kaspaza i razgradnja stanica procesom apoptoze.

Kaspaza-9 aktivira razgradnju stanice kao odgovor na čimbenike koji potiču izlazak citokroma c i drugih proapoptotičkih proteina iz mitohondrija u citosol (14). Aktivira se formiranjem kompleksa, tzv. apoptosoma kojeg, uz prokaspazu-9 i dATP, čine APAF1 te citokrom c (15). Kaspaze-8, -10 i -9, proteolitičkom razgradnjom aktiviraju kaspaze-3, -6 i/ili -7 te proces apoptoze ulazi u **izvršnu fazu**. Proteolitičkim kidanjem aktivirane kaspaze dalje razgrađuju brojne različite stanične proteine (11,12,13,16,17), npr. dijelove staničnog skeleta (2,18), a endonukleaze kidaju DNA i time dovode do karakterističnih morfoloških promjena stanice u apoptozi: pupanja stanične membrane, smanjivanja volumena stanice, piknoze i fragmentacije stanične jezgre. Stanica se fragmentira u tzv. apoptotička tjelešca koja sadrže kondenzirani kromatin jezgre i naizgled nepromijenjene organele (1). U ovoj fazi moguće je opaziti nekoliko značajnih osobina stanice u apoptozi: fragmentaciju DNA na višekratnike veličine približno 200 parova baza, proteolitičko kidanje poli(ADP-riboza) polimeraze i komponenti citoskeleta poput aktina (18), te prisutnost fosfatidilserina na površini stanica odnosno apoptotičkih tijela (19).

Indukcija apoptoze moguća je i otkazivanjem supresorske aktivnosti anti-apoptotičnih člano-

va Bcl-2. Oslobođanje citokroma c iz mitohondrija u citosol rezultira aktivacijom kaspaza (14). U inicijaciji apoptoze ovim putem nužna je propusnost pora vanjske membrane mitohondrija. Proteini obitelji Bcl-2 imaju značajnu ulogu u regulaciji propusnosti membrane za ione te vjerojatno i za citokrom c (19). Obitelj Bcl-2 čine dvije skupine proteina: anti-apoptotički čimbenici, koji kada su pojačano eksprimirani, potiskuju apoptozu i pro-apoptotički čimbenici koji, uz pojačanu ekspresiju, potiču apoptozu. Dinamička ravnoteža između anti-apoptotičkih i proapoptotičkih članova obitelji Bcl-2 vjerojatno igra ključnu ulogu pri odlučivanju o sudbini stanice. Aktivnost anti-apoptotičnih članova obitelji Bcl-2 važna je za neutralizaciju djelovanja pro-apoptotičkih članova (2).

### 3. ULOGA APOPTOZE U PATOFIZIOLOŠKIM PROCESIMA

Apoptoza pridonosi prilagođavanju stanice i okoliša, te smo vjerojatno tek na početku shvaćanja njene značajnosti u fiziološkim i patofizio-

loškim procesima. Međutim, to su temelji za primjenu apoptoze u dijagnostici i terapiji.

U zadnjih desetak godina, velik se broj patoloških stanja povezuje s ubrzanim ili usporanim procesom apoptoze. Apoptoza se neplanirano javlja u stanicama koje nemaju sposobnost obnavljanja, kao npr. kod nekih neurodegenerativnih bolesti gdje proces ima fatalne posljedice (21,22). Novije spoznaje ističu ulogu apoptoze u etiologiji i patofiziologiji uobičajenih bolesti u ljudi poput oboljenja srca (7,23), ateroskleroze (24), hipertenzije (25), šećerne bolesti (26), jetrenih oboljenja (6) itd. Apoptoza može biti potaknuta i čimbenicima kao što su zračenje i virusne infekcije poput side (27). Stimulirana apoptoza je dokazana npr. u postishemijskim bubrežima u životinja (28), kod eksperimentalne nefropatije (29), kod kliničke akutne bubrežne bolesti u ljudi i u posttransplantacijskoj akutnoj bubrežnoj bolesti, gdje se javlja uz nekrozu (30).

S druge strane, ako se zbog nekih poremećaja stanice ne uspiju podvrgnuti prirodnoj apoptozi, mogu se razviti autoimune bolesti, odnosno zloćudno bujanje stanica (31). Stoga je pravilno i pravodobno odvijanje procesa apoptoze od životne važnosti za organizam.

Tablica 2. Tehnike za detekciju i kvantifikaciju apoptoze

Table 2. Techniques for detection and quantification of apoptosis

Tehnika	Uzorak	Primjena	Prednost	Nedostatak
<b>Morfološke promjene</b>				
- Svjetlosna mikroskopija - Elektronska mikroskopija	Tkivni preparat	In vitro In vitro	Očuvanost histološke slike Sve faze apoptoze Visoka specifičnost	Kasna faza apoptoze Dugotrajna procedura
- Protočna citometrija	Intaktne stanice	In vitro	Brza i kvantitativna analiza	Niska specifičnost
<b>Promjene u citoplazmi</b>				
- Aktivnost kaspaza	Tkivni preparat	In vitro	Visoka specifičnost	Informacija na bazi stanične populacije
- Prodor kalcija	Stanični lizat	In vitro	Rana faza apoptoze	Niska specifičnost Niska specifičnost
- Disfunkcija mitohondrija	Intaktne stanice	In vitro		
<b>Fragmentacija DNA</b>				
- Internukleosomna fragmentacija DNA	Stanični lizat Tkivni homogenat	In vitro In vitro	Brza i kvantitativna analiza	Kasna faza apoptoze Informacija na bazi stanične populacije Kasna faza apoptoze
- Sadržaj DNA s pomoću protočne citometrije	Intaktne stanice	In vitro		
- Označavanje napuknuća DNA lanca (mikroskopija) (protočna citometrija)	Tkivni preparat Intaktne stanice	In vitro In vitro	Očuvanost hitološke slike	Kasna faza apoptoze Fagolizosomno bojanje
<b>Narušavanje strukture membrane</b>				
- Propusnost membrane	Intaktne stanice	In vitro	Sve faze apoptoze Prikazivanje vijabilnosti	Kasna faza apoptoze Oboje se i nekrotične stanice Oboje se i nekrotične stanice
- Promjene u membrani	Intaktno tkivo Intaktne stanice	In vitro In vitro		

#### 4. TEHNIKE I METODE OTKRIVANJA I ODREĐIVANJA APOPTOZE

Prve tehnike za određivanje apoptoze temeljile su se na definiranju apoptoze prema morfološkim značajkama. Tijekom zadnjeg desetljeća, tehnike su se proširile na biokemijske, molekularno-biološke i imunološke, najviše zahvaljujući saznanjima o molekularnom mehanizmu apoptoze (6,7,8,9,10). Uzorak za analizu u većini slučajeva je biopsat tkiva. U tablici 2 navedene su tehnike i metode otkrivanja i određivanja apoptoze s prednostima i nedostacima.

##### 4.1. Svjetlosna mikroskopija

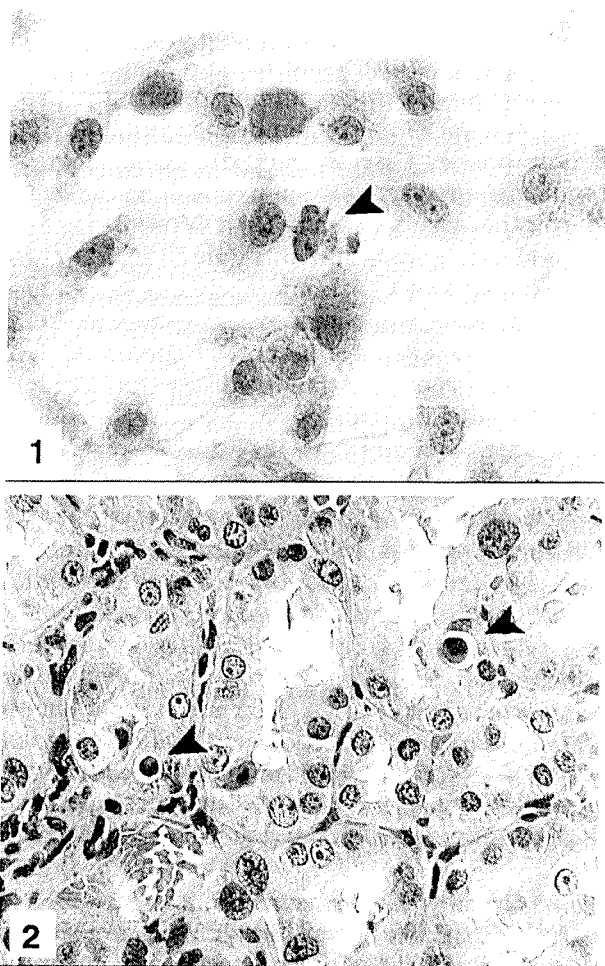
Svjetlosna mikroskopija je najranije primijenjena tehnika za otkrivanje apoptoze i ona predstavlja zlatni standard za istraživanje morfologije stanice. Pupanje stanične membrane, smanjivanje volumena stanice, piknoza i fragmentacija stanične jezgre mogu se učiniti vidljivim u histološkim preparatima obojenima hematoksilinom i eozinom (slika 1). Nedostatak ove tehnike je nedovoljna osjetljivost, prvenstveno zato što sam proces traje 30-60 minuta, a fagocitozom se apoptotične stanice vrlo brzo uklanjaju. Stoga je vrlo vjerojatno da svjetlosnom mikroskopijom otkrivamo samo vrh sante leda (1,8).

##### 4.2. Elektronska mikroskopija

Velika prednost elektronske mikroskopije je njezina visoka osjetljivost. Morfološke promjene mogu se otkriti na unutarstaničnoj razini, pri čemu se povećava osjetljivost i specifičnost u odnosu na svjetlosnu mikroskopiju (slika 2). Otežavajuće okolnosti ove tehnike su zahtjevne pripreme materijala i ograničeni broj stanica koje se mogu istraživati, te stoga ova tehnika nije prikladna za rutinski rad. Elektronska mikroskopija je specifična i osjetljiva tehnika, ali samo kao kvalitativna metoda u otkrivanju apoptoze (33). (Slika 2)

##### 4.3. Protočna citometrija

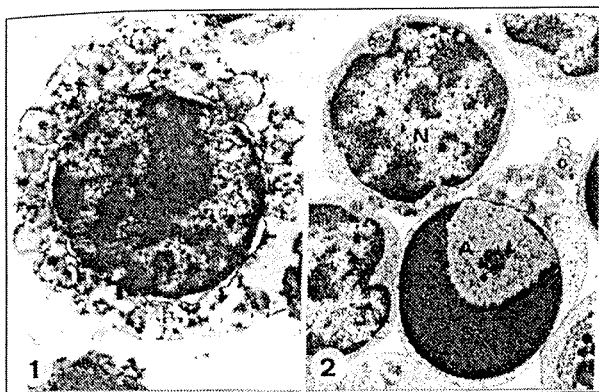
Protočna citometrija omogućava analizu velikog broja stanica u vrlo kratkom vremenu. Postupci manipuliranja sa stanicama u većini su slučajeva vrlo jednostavni. Kako su apoptotične stanice kondenzirane (suprotno od nekrotičnih stanica koje nabubre), to rezultira smanjenjem raspršivanja svjetla, a bočno se raspršivanje slabo povećava (9). Kod ove tehnike kao uzorak koristimo suspenziju stanica, što ograničava njezinu primjenu u rutinskom radu. Protočna



Slika 1. Prikaz 1. Fotomikrografija preparata s adheriranim MDCK stanicama. Preparat je obojen hematoksilinom i eozinom (povećanje  $\times 630$ ). Može se vidjeti stanica u apoptozi te početak formiranja apoptotičnih tjelešaca ( $\blacktriangle$ ). Prikaz 2. Fotomikrografija preparata tkiva bubrega štakora iz parafinskog bloka. Preparat je obojen hematoksilinom i eozinom (povećanje  $\times 630$ ). Vidljive su apoptotičke stanice ( $\blacktriangle$ ) u tkivu bubrega.

Figure 1. (Slide 1.) Photomicrograph of adhered MDCK cells is shown. The cells are stained with hematoxylin and eosin ( $\times 630$ ). Cell in apoptosis and apoptotic body formation ( $\blacktriangle$ ) can be seen. (Slide 2) Microscopy image of thin-sectioned fixed, paraffin-embedded rat kidney are shown (hematoxylin and eosin  $\times 630$ ). Apoptotic cells ( $\blacktriangle$ ) are seen in kidney tissue.

citometrija je izvrsna metoda za *in vitro* istraživanja, ali nije prikladna za otkrivanje apoptoze u tkivima, budući da dovodi do gubitka histološkog konteksta.



Slika 2. Prikaz 1. Elektronska mikrografija nekrotične stanice: vidi se narušena struktura plazmatske membrane i organela. Morfologija stanične jezgre je relativno očuvana (povećanje  $\times 10000$ ). Prikaz 2. Elektronska mikrografija apoptotične (A) i normalne (N) stanice. U apoptotičnim jezgrama pojavljuje se karakteristična reorganizacija kromatina, što se znatno razlikuje u odnosu na normalne stanice. Plazmatska membrana i organele dobro su očuvane (povećanje  $\times 8000$ ).

Figure 2. (Slide 1) Electron micrograph of a necrotic cell: the disruption of plasma membrane and organelles is observable. A relative preservation of nuclear morphology appears (original magnification:  $\times 10,000$ ) (Slide 2). Electron micrograph of an apoptotic (A) and a normal (N) cell. The characteristic chromatin rearrangement appears in A, strongly different from its normal organization (N). Good preservation of membrane and organelles is also evident (original magnification:  $\times 8,000$ ).

#### 4.4. Aktivnost kaspaza

Kaspaze predstavljaju obitelj cisteinskih proteaza i kidaju ciljne supstrate iza asparaginske kiseline (Asp-X veza). One su prisutne u citoplazmi i staničnim organelama kao neaktivni prekursori, a aktiviraju se kidanjem iza specifičnog asparaginskog ostatka. Danas primjenjujemo različite fluorogene i kromogene supstrate za razlikovanje aktivnih kaspaza. Većina ovih supstrata ne može prijeći staničnu membranu, pa je pri određivanju aktivnosti kaspaza potrebno homogenizirati stanice ili tkiva (34). Ovi supstrati uglavnom nisu specifični samo za jednu kaspazu i u većini slučajeva teško je povezati određenu fluorogenu ili kromogenu aktivnost s jednom specifičnom kaspazom.

Aktivnost kaspaze može se odrediti i imunohistokemijskim tehnikama, koristeći antitijela

protiv neoeptopa, koji se otkrivaju nakon proteolitičke aktivacije kaspaza (18,35,36).

Nadalje, aktivnost kaspaza može se detektirati primjenom antitijela koja prepoznaju samo već degradirane stanične supstrate kaspaza. U novije vrijeme opisana su antitijela koje prepoznaju razgrađeni citokeratan 18 (35), aktin (18) i poli-ADP-riboza polimeraze (PARP) (36). PARP je protein veličine 113 kDa koji se specifično veže za krajeve uzvojnice DNA. On je također supstrat za kaspaze-3 i -7 koje ga kidaju na fragmente veličine oko 24 i 89 kDa. Otkrivanje ulomka veličine 89 kDa anti-PARP antitijelom služi kao rani biljeg apoptoze u stanicama. To se antitijelo može koristiti i za detekciju intaktne PARP. Ovi imunokemijski postupci zahtijevaju fiksiranje uzorka.

#### 4.5. Promjena koncentracije staničnog kalcija

Aktivacijom apoptotičnog puta u većini slučajeva dolazi do porasta koncentracije staničnog kalcija, što se može detektirati korištenjem indikatora za  $\text{Ca}^{2+}$  kao što je fura-2 (37). Nedostatak ovih tehnika je u tome što porast koncentracije staničnog  $\text{Ca}^{2+}$  nije isključivo vezan uz apoptozu nego može biti posljedica aktivacije niza drugih signalnih puteva koji na kraju ne završavaju apoptozom.

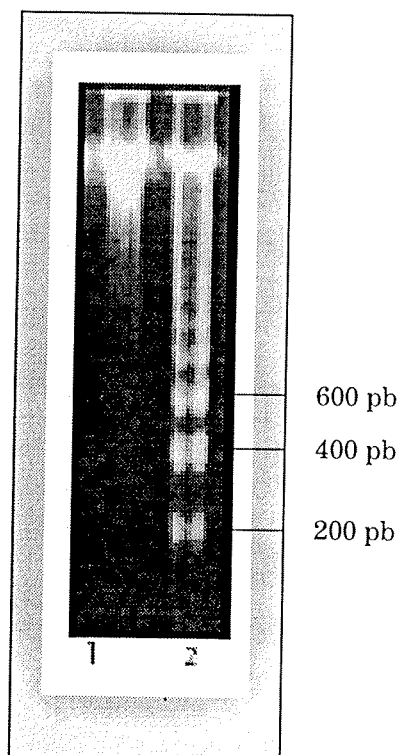
#### 4.6. Disfunkcija mitohondrija

Pad mitohondrijskog membranskog potencijala je raniji pokazatelj apoptoze i predstavlja točku na putu stanične smrti s koje više nema povratka. Mitohondrijski potencijal može se mjeriti korištenjem različitih fluorescentnih proba koje se nakupljaju u mitohondrijima. Narušavanje mitohondrijskoga membranskog potencijala povećavat će sposobnost ovih fluorokroma da se akumuliraju u mitohondrijima (38). Osim toga, može se odrediti translokacija nekoliko proapoptotičnih proteina iz međumembranskog odjeljka u citosol. Među ove molekule spadaju AIF (39) citokrom c (40) i prokaspaze -2, -3, i -9 (12,13). Translokacija ovih proteina može se dokazati imunokemijskim tehnikama, uporabom specifičnih antitijela (41). Jedan od mogućih nedostataka ovih postupaka je njihova niska osjetljivost, budući da pojedini apoptotički putevi zaobilaze mitohondrije.

#### 4.7. Fragmentacija DNA

Internukleosomna razgradnja DNA jedna je od karakterističnih pojava u apoptozi. Tijekom apoptoze aktivirane endonukleaze kidaju mole-

kule DNA u ulomke koje su po veličini višekratnici 180-200 parova baza. Nakon provedene elektroforeze na agaroznom gelu ovi ulomci izgledaju poput ljestvi, slika 3 (42). Ograničavajuća okolnost ove metode je da je potrebno imati relativno veliki broj stanica u apoptozi kako bi se degradacijski produkti mogli opaziti. S druge strane, s pomoću lančane reakcije s polimerazom (PCR), moguće je selektivno umnožiti karakteristične ulomke (43). U pojedinim sluča-



Slika 3. DNA izolirana iz stanica, razdvojena je elektroforezom na agaroznom gelu. Vrpca 1. stanice bez tretmana, DNA je razvučena u vidu razvučene nrlje, prisutno je malo niskomolekularne DNA. Vrpca 2. tretiranje agensima koji mogu potaknuti apoptozu, primjerice staurosporinom,  $H_2O_2$ , deksametazonom itd., dovodi do stvaranja "ljestvi" od ulomaka DNA koji se razlikuju za 200 pb, a u konačnici svake DNA biti fragmentirana u ulomke od 180-200 pb.

Figure 3. DNA is isolated from cells and run on an agarose gel. Lane 1: no treatment, DNA runs as a smear; little LMW DNA present. Lane 2: treatment with some type of apoptosis-inducing agent, including staurosporine,  $H_2O_2$ , dexamethasone, etc. Resulting "ladder" has 200 bp periodicity; ultimately all DNA will be cut into 180-200 bp long fragments.

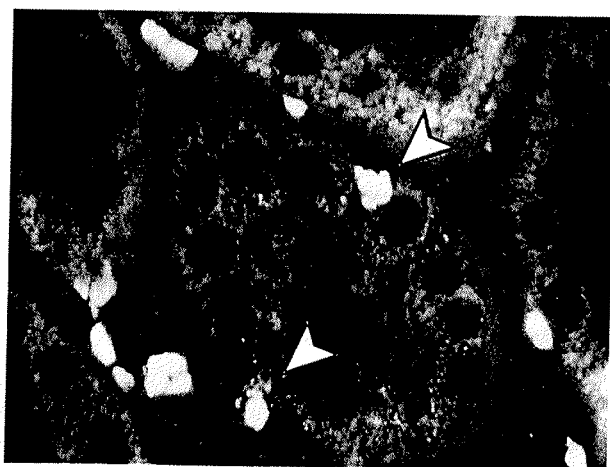
jevima apoptoze ne nastaju niskomolekularni, nego samo viskomolekularni ulomci, što je potrebno naglasiti.

#### 4.8. Određivanje sadržaja DNA s pomoću protočne citometrije

Sadržaj DNA u stanici grubo odražava faze, odnosno međufaze, staničnog ciklusa ( $G_0/G_1$ , S/C i M). Apoptotične stanice imaju sadržaj DNA ispod one razine koja je u prijelazu faza  $G_0/G_1$ . To se može odrediti s pomoću protočnog citometra i boja koje se vežu na nukleinske kiseline poput propidijevog jodida. Ovom se tehnikom također mogu razlikovati apoptočki od nekrotičkih načina umiranja stanica (9, 47).

#### 4.9. Označavanje lomova lanca DNA

Detekcija apoptoze na staničnoj razini s pomoću tzv. TUNEL metode (engl. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) može se koristiti za označavanje jednostrukih i dvostrukih lomova lanca DNA u tkivnim preparatima i suspenzijama stanica (44,45). Terminalna deoksinukleotidil transferaza (TdT) katalizira polimerizaciju nukleotida na 3'OH kraju molekule DNA (način neovisan o kalupu), a vezivanjem dUTP-a obilježenog



Slika 4. Fluorescentna mikroskopija stanica bubrega štakora tretiranog okratoksinom A. Fotomikrografija preparata obojena FITC-dUTP-om, s pomoću tehnike TUNEL (povećanje  $\times 630$ ). TUNEL-pozitivni nukleusi ukazuju na stanice u apoptozi ( $\Delta$ ).

Figure 4. Fluorescence microscopy of kidney cells from rats treated with ochratoxin A. Photomicrograph of section stained with FITC-dUTP by TUNEL technique is shown ( $\times 630$ ). The positive TUNEL nuclei indicating apoptotic cells ( $\Delta$ ) are stained yellow-green.

fluoresceinom označava se prekid u lancu DNA. Stanice koje umiru apoptozom, tj. stanične jezgre s ugrađenim fluorescentnim obilježivačem u molekuli DNA, mogu se detektirati s pomoću fluorescentnog mikroskopa (slika 4) ili protočnog citometra. Osim fluorescentnim bojama moguće je obilježiti dUTP i biotinom ili digoksigeninom. Slična tehnika je ISEL (engl. *In situ* nick end labeling) uz DNA polimerazu (46).

#### 4.10. Promjene propusnosti membrane

Apoptoza se prepoznaje po promijenjenoj staničnoj morfologiji pri čemu stanična membrana ostaje intaktna i ne dozvoljava prodiranje boja poput tripan-plavila i propidijevog jodida. Ovaj fenomen dozvoljava razlikovanje apoptotičnih u odnosu na nekrotične stanice. Posebno korisnim pokazale su se kombinacije analiza morfološke karakterizacije i ulaska nestalnih boja uz primjenu protočnog citometra (47).

#### 4.11. Promjene na staničnoj membrani

Kod stanica u apoptozi fosfatidilserin (PS) se nalazi na vanjskoj strani stanične membrane, što se može odrediti deriviranjem s fluoreskaminom i naknadnom analizom stvorenih derivata, ekstrahiranih membranskih lipida, s dvodimenzionalnom tankoslojnom kromatografijom (48).

Novije tehnike za određivanje PS na staničnoj površini koriste Annexin-V. Osnova ovih tehnika je vrlo jednostavna, a postupak se lako izvodi. Annexin-V veže se na PS na membrani apoptotičnih stanica ovisno o koncentraciji kalcija. Annexin-V označen fluoresceinom ili bioti-

nom omogućava detekciju stanica s PS na površini membrane (19,49). Osjetljivost i specifičnost metoda koje koriste Annexin-V ovisi o biološkim osobinama PS te o fizikalno-kemijskim obilježjima Annexina-V pri vezivanju za PS.

### 5. ZAKLJUČAK

Ubrzani ili usporeni proces apoptoze povezan je s etiologijom i patogenezo različitih bolesti. Stoga su ispitivanja apoptoze značajna radi boljeg razumijevanja stanja organa, u svrhu dijagnostike i liječenja oboljenja.

Nedostatak pojedinih tehnika detekcije i/ili kvantifikacije apoptoze prvenstveno se odnosi na određivanje parametara koji pripadaju kasnoj izvršnoj fazi apoptotičkog procesa. Kako se u ovoj fazi stanice u apoptozi brzo uklanjaju fagocitozom, određivanje broja apoptotičnih stanica u različitim tkivima može biti podcijenjeno. Korisno bi bilo razvijati takve metode koje mjere aktivne parametre prisutne između faze odluke i faze izvršenja apoptotičkog procesa.

Kombinacijom morfoloških i biokemijskih metoda, odnosno određivanjem više parametara za isti uzorak, može se znatno povećati osjetljivost i specifičnost mjerenja te kvalitetnije procijeniti proces apoptoze u tkivima i kultutama stanica.

Zahvaljujemo tvrtki *Roche Diagnostics* za novčano potpomaganje tiskanja slikovnih priloga u ovom članku.

### APOPTOSIS – DETECTION AND QUANTIFICATION

**ABSTRACT** – Apoptosis, or programmed cell death, is not only the process of natural restoring of cells and tissues, but has also become appreciated as an important factor in the development of numerous pathological conditions. Thorough understanding of the apoptotic process is essential in order to apply this knowledge for diagnosis and therapeutic purpose.

In this review, the available techniques for detection and/or quantification of apoptosis have been summarized. These methods are based on the analysis of cellular morphology, either by light or electron microscopy, on biochemical features, on internucleosomal DNA fragmentation or on the DNA single or double strand breaks labelling (TUNEL or ISEL methods). Furthermore, certain methods to monitor the changes in cytoplasm are discussed, e.g. determination of the activities of certain caspases, or changes on the membrane, e.g. detection of phosphatidylserine expression on the outer leaflet. The advantages and limitations of these techniques are also outlined in this review.

**Keywords:** Apoptosis



## LITERATURA

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
- Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* 1996;21:83-86.
- Erickson GF. Defining Apoptosis: Players and Systems. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 1997;4(5):219-228.
- Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Cellular injury and cellular death. U: *Pathologic basis of disease*. 5. izd. Saunders Company 1994;1-34.
- Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 1996;271:F477-F488.
- Bai J, Odin JA. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmunity Reviews* 2003;2(1):36-42.
- van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, Hofstra L, Doevendans PA, Smits JFM, Daemen MJAP, Reutelingsperger CPM. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovascular Research* 2000;45(3):549-559.
- Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Goge G, Connor J, O Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *AM J Pathology* 1992;140:831-838.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, DelBino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992;13:795-808.
- Gurtu V, Kain SR, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem* 1997;251:98-102.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998;140:1485-1495.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999;189:381-394.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
- Barišić K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm* 2003;53:151-164.
- Yang F, Sun X, Beech W, Teter B, Wu S, Sigel J, Vinters HV, Frautsch SA, Cole GM. Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1998;152:379-389.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger CPM. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-52.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997;34(5):9-19.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
- Ihara T, Yamamoto T, Sugamata M, Okumura H, Ueno Y. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch* 1998;433:443-447.
- Rössig L, Haendeler J, Mallat Z, Hugel B, Freyssinet JM, Tedgui A, Dimmeler S, Zeiher AM. Congestive heart failure induces endothelial cell apoptosis: protective role of carvedilol. *Journal of the American College of Cardiology* 2000;36(7):2081-2089.
- Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999;99:348-353.
- González A, Fortuno MA, Querejeta R, Ravassa S, López B, López N, Díez J. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, Issue 3, 2003;59:549-562.
- Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochemical Pharmacology* 2003;66(8):1433-1440.
- Ikuta K, Kameoka M, Luftig RB. AIDS pathogenesis: the role of accessory gene mutations, leading to formation of long-lived persistently infected cells and/or apoptosis-inducing HIV-1 particles. *Virus Research* 1997;52(2):145-156.
- Chien CT, Hsu SM, Chen CF, Lee PH, Lai MK. Hypoxic preconditioning reduces ischemia/reperfusion-induced apoptosis cell death in rat kidney<sup>1</sup>. *Transplantation Proceedings* 2000;32(7):1653-1654.
- Petrik J, Žanić-Grubišić T, Barišić K, Pepelnjak S, Radić B, Ferenčić Ž, Čepelak I. Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Arch Toxicol*, 2003; 77:685-693.
- Aravind L, Dixit VM, Koonin EV. The domains of death: evolution of apoptosis machinery. *TIBS* 1999;24:47-53.
- Zhivotovsky B, Orrenius S. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Seminars in Cancer Biology* 2003;13(2):125-134.
- Hergartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.
- Gorman A, McCarthy J, Finucane D, Reville W, Cotter T. Morphological assessment of apoptosis. U: Cotter TG, Martin SJ, ur. *Techniques in apoptosis. A user's guide*. London: Portland Press, 1996; 1-20.
- Gurtu V, Kain SR, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem* 1997;251:98-102.
- Leers MPG, Kolgen W, Bjorkland V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers FC, Bjorklund B, Nap M, Jorvall H, Schutte B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neoepitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999;187:567-572.
- Sallmann FR, Bourassa S, Saint-Cyr J, Poirier GG. Characterization of antibodies specific for the caspase cleavage site on poly(ADP-ribose) polymerase: specific detection of apoptotic fragments and mapping of the necrotic fragments of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Cell Biol* 1997;75:451-456.



37. McConkey DJ. Calcium flux measurement in cell death. U: Cotter TG, Martin SJ, ur. *Techniques in apoptosis. A user's guide*. London; Portland Press, 1996; 133-148.
38. Metivier D, Dallaporta B, Zamzami N, Larochette N, Susin SA, Marzo I, Kroemer G. Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunol Lett* 1998;611:157-163.
39. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-446.
40. Kluck RM, Bossy Wetzl E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136.
41. Bossy-Wetzl E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998;17:37-49.
42. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 1995;146:1325-1331.
43. Staley K, Blaschke AJ, Chun J. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death Diff* 1997;4: 66-75.
44. Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ, Gong J, Darzynkiewicz Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int J Oncol* 1992;1: 639-648.
45. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;199:493-501.
46. Meygaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992;257:217-219.
47. Darzynkiewicz Z, Li X. Measurements of cell death by flow cytometry. U: Cotter TG, Martin SJ, ur. *Techniques in apoptosis. A user's guide*. London: Portland Press, 1996; 71-106.
48. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
49. Homburg CHE, De Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood* 1995;85:532-540.